

201128240A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

「膠様滴状角膜変性症の標準的治療レジメンの
確立と新規治療法の創出」に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 川崎 諭

平成24（2012）年3月

目 次

I.	班員構成	1
II.	総括研究報告	
	膠様滴状角膜変性症の標準治療レジメンの確立と新規療法の創出	2
	川崎 諭	
III.	分担研究報告	
1.	膠様滴状角膜変性症の疾患モデル細胞の作製	7
	川崎 諭	
2.	膠様滴状角膜変性新規治療の創出のための基礎的研究	12
	村上 晶	
3.	膠様滴状角膜ジストロフィの遺伝的背景	15
	辻川元一	
4.	膠様滴状角膜変性症の全層角膜移植術後再発症例に対する共焦点顕微鏡検査 及び前眼部光干渉断層計検査	18
	天野史郎	
5.	膠様滴状角膜ジストロフィにおける2つの新規変異と野生型および 変異型TACSTD2の細胞内局在についての分子生物学的検討	20
	稲富 勉	
IV.	膠様滴状角膜ジストロフィ治療指針	24
V.	膠状滴状角膜ジストロフィ診断基準	25
VI.	研究成果の刊行に関する一覧表	26
VII.	研究成果の刊行物・別刷	27

[I]

班員構成

平成 23 年 度 班 員 構 成

研究者名		所属等	職名
研究代表者	川崎 諭	京都府立医科大学 眼科学教室	助 教
研究分担者	村上 晶	順天堂大学医学部 眼科学教室	教 授
	天野 史郎	東京大学医学部 眼科学教室	教 授
	稲富 勉	京都府立医科大学 眼科学教室	助 教
	辻川 元一	大阪大学医学部 眼科学教室	助 教
研究協力者	福本 暁子	京都府立医科大学 眼科学教室	大学院生
	足立 紘子	京都府立医科大学 眼科学教室	大学院生
	篠宮 克彦	京都府立医科大学 眼科学教室	特任助教
	西田 幸二	大阪大学医学部 眼科学教室	教 授
	相馬 剛至	大阪大学医学部 眼科学教室	医 員
	海老原伸行	順天堂大学医学部 眼科学教室	前任准教授
	松田 彰	順天堂大学医学部 眼科学教室	准教授
	舟木 俊成	順天堂大学医学部 眼科学教室	准教授
	臼井 智彦	東京大学医学部附属病院 眼科学教室	助 教
	宮井 尊史	東京大学医学部附属病院 眼科学教室	助 教

[Ⅱ]

総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
課題「膠様滴状角膜変性症の標準治療レジメンの確立と新規療法の創出」

総括研究報告書
「膠様滴状角膜変性症の標準治療レジメンの確立と新規療法の創出」

研究代表者 川崎 諭 京都府立医科大学眼科学教室 助教

【研究要旨】

膠様滴状角膜変性症は10歳代に角膜上皮直下にアミロイド沈着が生じ、次第に角膜全面を覆うために著明な視力低下を来す疾患である。常染色体劣性遺伝を呈し、責任遺伝子として1999年に辻川らによってTACSTD2遺伝子が同定された。しかしながらその病態の詳細は未だ不明で、また希な疾患であるため臨床的にも様々な点において不明な状況が続いている。

昨年度、角膜専門外来をもち本疾患について積極的に診断・治療を行っている国内4施設（京都府立医科大学、大阪大学、順天堂大学、東京大学）において本疾患患者45例90眼について疫学背景、臨床像、治療成績についてデータを収集し、その成果として本疾患に対する標準的治療レジメンを作成した。また極めて重要な知見として、ソフトコンタクトレンズの装用が膠様滴状角膜変性症の角膜移植術後の再発抑制に極めて有効であるということが明らかとなった。また分子レベルでの膠様滴状角膜変性症の病態解明に取り組み、膠様滴状角膜変性症ではTACSTD2遺伝子の機能喪失型変異によりクローディン1および7のタンパク分解を介してタイトジャンクションの形成不全が起こり上皮バリア機能の著明な低下を来すことが明らかにした。

今年度はそれらの結果を踏まえ、さらなる病態解明、治療法の開発に取り組んだ。その成果として、膠様滴状角膜変性症患者由来の角膜上皮および結膜上皮細胞の不死化細胞の樹立に成功した。またソフトコンタクトレンズを基質として角膜上皮細胞を培養することに成功し、効率的な遺伝子導入方法の確立のための一助となった。一方でin vitroにおけるよりorganotypicな評価系確立のための基礎研究として培養角膜および口腔粘膜上皮シートにおけるTACSTD2タンパクの発現を確認した。臨床的には膠様滴状角膜変性症患者3例において新規の遺伝子変異を発見し、さらに前眼部OCTが膠様滴状角膜変性症の術後再発の評価系として有用であることを見出した。

研究分担者

1. 村上 晶・順天堂大学 眼科学教室・教授
2. 天野史郎・東京大学 医学部附属

病院 眼科学教室・教授

3. 稲富 勉・京都府立医科大学 医学(系)研究科(研究院) 眼科学教室・助教

4. 辻川元一・大阪大学 大阪大学・
医学(系)研究科(研究院) 眼科
学教室・助教

A. 研究目的

膠様滴状角膜変性症は 10 歳代に角膜上皮直下にアミロイド沈着が生じ、次第に角膜全面を覆うために著明な視力低下を来す疾患である。常染色体劣性遺伝を呈し発症頻度は稀であるが、日本人特有の疾患であることから大阪大学の辻川らによってその責任遺伝子として TACSTD2 遺伝子が同定された。しかしながら TACSTD2 遺伝子変異がいかんして本疾患の病態を引き起こすかについてはこれまで不明であった。本疾患は希な疾患であるためこれまでその疫学的情報については不明な点が少なくなかった。また本疾患は再発傾向が強く、他疾患にくらべてステロイド緑内障を合併しやすいことなどが知られていたが、その理由および予防策については明らかにされていなかった。さらに本疾患に対する外科的治療である表層角膜移植、角膜上皮移植、角膜表層切除についても、治療時期と治療法の最適な組み合わせについては明らかではなかった。

このような背景のもと、昨年度我々は本研究班の 4 施設を受診し膠様滴状角膜変性症と診断された 45 例 90 眼について臨床データを採取し、疫学的検討と術式毎の治療成績およびソフトコンタクトレンズ装用の有無による術後の再発の有無について検討し意義深い結果を得た。また本疾患の原因遺伝子である TACSTD2 遺伝子の機能喪失性変異がどのような機序で本疾患の病態のカギとも言える上皮バリア機能の低下を来すのかにつ

いて極めて意義深い結果を得た。

今年度は疾患モデルの作製として、本疾患患者由来の不死化角膜上皮細胞の作製を行った。また全国調査のための準備を行うとともに、各大学の分担者においては、独自の視点で膠様滴状角膜変性症の基礎的または臨床的研究を行った。

B. 研究方法

1. 詳細な病態の解明および治療法の開発を目指して膠様滴状角膜変性症患者由来の角膜および結膜上皮細胞の不死化細胞の樹立を行った。(詳細は川崎の分担研究報告を参照)
2. コンタクトレンズ (P-CL) をデバイスとした角膜上皮細胞培養及び細胞移入の検討を行った。(詳細は村上の分担研究報告を参照)
3. 角膜および口腔粘膜上皮シートおよびマウス角膜における TACSTD2 の発現を解析した。(詳細は辻川の分担研究報告を参照)
4. GDLD に対する全層角膜移植術後再発症例に対し、生体共焦点顕微鏡検査及び前眼部光干渉断層計検査を行った。(詳細は天野の分担研究報告を参照)
5. 3 人の膠様滴状角膜変性症患者より 2 つの新規変異として、p. Ile281SerfsX23 と p. Tyr225X を発見し、それらの病的意義について in vitro で

解析した。(詳細は稲富の分担研究報告を参照)

C. 研究結果

研究代表者の川崎は本疾患のモデル細胞として本疾患患者由来の角膜および上皮細胞の不死化細胞の樹立に成功した。この不死化細胞は本疾患患者角膜において認められる上皮バリア機能の低下、クローディン1および7タンパク発現の低下などの特徴を有しており、本疾患のさらなる病態解明ならびに治療法の開発に極めて有用な細胞であると考えられた。

研究分担者の村上はコンタクトレンズを用いて本疾患の原因遺伝子である TACSTD2 遺伝子を患者角膜に継続的に移入することを考えており、そのための基礎的検討としてリン酸基を側鎖に有するハイドロゲルからなるコンタクトレンズ (P-CL) をデバイスとした角膜上皮細胞培養及び細胞移入の検討を行った。結果として、*in vitro*におけるCL上に対するHCE-Tの培養は材質により異なり、P-CLにおいては、GFPトランスジェニックラビットの角膜輪部から採取した細胞の増殖も良好であり、免疫染色による未分化細胞マーカー (p63) の発現も認められた。また、CL上に単層培養したCLを装着させた日本白色家兎眼においても、細胞の移行が認められた。

研究分担者の辻川は実際の角膜上皮再生治療に使われる角膜上皮ないし口腔粘膜上皮シートにおけるTACSTD2遺伝子の発現について検討し

た。結果として、ヒト角膜ではTACSTD2タンパクは角膜上皮の全層に発現し、特に表層細胞のapical側に強い発現を認めた。ヒト角膜上皮シート、ヒト口腔粘膜上皮細胞シートにおいても発現を認め、シグナルの強度にヒト角膜と大きな差異を認めなかった。一方、マウス角膜においては免疫組織化学のシグナルはきわめて弱かった。しかし、RT-PCRではマウス角膜も含め、すべての検体においてTACSTD2のRNAレベルでの発現を認めた。

研究分担者の天野は膠様滴状角膜変性症の全層角膜移植術後再発症例に対する共焦点顕微鏡検査及び前眼部光干渉断層計検査 (OCT) を行い、再発によるアミロイド沈着部位に相当する部位に高輝度のシグナルを観察した。前眼部OCTは膠様滴状角膜変性症の全層角膜移植術後の再発に対する高感度な評価法として有用であり、またアミロイドの沈着過程を客観的、半定量的に評価できるという利点があることがわかった。

研究分担者の稲富はGDLDの新規変異を2つ発見している。この変異はc.840_841insTCATCATCGCCGGCCTCATCとc.675C>Aで各々フレームシフト変異 (p.Ile281SerfsX23) とノンセンス変異 (p.Tyr225X) をおこして本疾患を引き起こすと考えられた。これまで報告がなく、またCpGジヌクレオチド部位の変異ではないことから日本人において発生した創始者変異であると考えられた。さらに稲富はこれらの

変異をもつTACSTD2遺伝子を発現するプラスミドを作製し、不死化ヒト角膜上皮細胞に遺伝子導入してその細胞内局在が野生型TACSTD2タンパクと比べ明らかに変化していることを示した。

D. 考案

本研究によって膠様滴状角膜変性症患者由来の不死化ヒト角膜および結膜上皮細胞の樹立に成功した。これらの細胞をウエスタンブロットで調べたところ、クローディン1および7の発現量に明らかな違いが認められ、また免疫染色ではそれらのタンパクの細胞内局在において野生型との間に明らかな違いを認めた。我々はこのクローディン1および7タンパクの細胞内局在の変化が分子病態を紐解くカギとなるものと考えており、ユビキチンやオートファジー、ライソゾーム、エンドソームとの関係を免疫染色で調べたが、有意な結果は得られなかった。しかしタンパクレベルの発現量において著しい低下が認められることから何らかの系によるタンパク分解の亢進は間違いなく存在するものと考えられ、次年度において再度詳細に検討する予定である。別の我々の研究においてクローディン1および7においてユビキチン化が起こらないことがほぼ確定的となっていることから、分解の経路としてはオートファジーかライソゾーム経路にほぼ絞られることとなり、次年度の課題と考えている。

本疾患患者由来の不死化細胞は治療法の確立においても極めて重要な研究リソースとなるものと期待できる。村上らのソフトコンタクトレンズ

による本疾患の治療法の開発においても評価系として使用したいと考えている。

残念ながら当初考えていたプロテアソーム阻害剤による治療可能性はクローディン1および7がユビキチン化しないことがほぼ確定的となった現在では困難であるとの結論に至った。実際、プロテアソーム阻害剤を不死化細胞に対して処理してみたが、上皮バリア機能の改善は認められなかった。

E. 結論

膠様滴状角膜変性症患者由来の不死化ヒト角膜および結膜上皮細胞の樹立に成功した。これらの細胞は膠様滴状角膜変性症の病的性質を忠実に再現しており、病態の解明や治療法の開発等において極めて有用な研究リソースとなることが期待された。またコンタクトレンズをデバイスとして用いることで角膜上皮細胞の培養が可能であり、角膜への細胞移入も可能であることが明らかとなった。今後TACSTD2遺伝子導入をおこなった角膜上皮細胞をソフトコンタクトレンズ上で培養して患者角膜へ移入する方法の開発などを行うなどの応用が考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表（平成22年度）

論文発表

巻末研究成果一覧表参照

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案特許

なし

3. その他

なし

[Ⅲ]

分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
課題「膠様滴状角膜変性症の標準治療レジメンの確立と新規療法の創出」

分担研究報告書

「膠様滴状角膜変性症の疾患モデル細胞の作製」

研究分担者 川崎 諭 京都府立医科大学眼科学教室 助教
研究協力者 篠宮克彦 京都府立医科大学眼科学教室 特任助教
福本暁子 京都府立医科大学眼科学教室 大学院生
足立紘子 京都府立医科大学眼科学教室 大学院生

【研究要旨】

膠様滴状角膜変性症は10歳代に角膜上皮直下にアミロイド沈着が生じ、次第に角膜全面を覆うために著明な視力低下を来す疾患である。常染色体劣性遺伝を呈し、責任遺伝子として1999年に辻川らによってTACSTD2遺伝子が同定された。しかしながらその病態の詳細は未だ不明で、また希な疾患であるため臨床的にも様々な点において不明な状況が続いている。平成22年度、我々は本疾患の病態について分子レベルの解明を試みた。その成果として膠様滴状角膜変性症ではTACSTD2遺伝子の機能喪失型変異によりクローディン1および7のタンパク分解を介してタイトジャンクションの形成不全が起こり上皮バリア機能の著明な低下を来すことが明らかとなった。今年度はさらに詳細な病態の解明および治療法の開発を目指して膠様滴状角膜変性症患者由来の角膜および結膜上皮細胞の不死化細胞の樹立を行った。

A. 研究目的

膠様滴状角膜変性症は10歳代に角膜上皮直下にアミロイド沈着が生じ、次第に角膜全面を覆うために著明な視力低下を来す疾患である。常染色体劣性遺伝を呈し発症頻度は稀であるが、日本人特有の疾患であることから大阪大学の辻川らによってその責任遺伝子としてTACSTD2遺伝子が同定された。しかしながらTACSTD2遺伝子変異がいかんして本疾患の病態を引き起こすかについてはこれまで不明であった。昨年度、我々は本疾患の病態について、TACSTD2遺伝子変異がいかんして本疾患の病態形成に関わるかについ

て、分子生物学的および生化学的なアプローチによって分子レベルでの解明を試みた。結果として膠様滴状角膜変性症ではTACSTD2遺伝子の機能喪失型変異によりクローディン1および7のタンパク分解を介してタイトジャンクションの形成不全が起こり上皮バリア機能の著明な低下を来すことが明らかとなった。今年度はさらに詳細な病態の解明および治療法の開発を目指して膠様滴状角膜変性症患者由来の角膜および結膜上皮細胞の不死化細胞の樹立を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1) PCRにてSV40 large T 抗原遺伝子とヒト telomere reverse transcriptase (hTERT) 遺伝子の cDNA を増幅してレンチウイルスベクター (plenti6.3 V5/TOPO) に組み込んだ。これをヘルパーベクターとともに 293T 細胞にトランスフェクトしてレンチウイルスベクターを作製した。

2) 膠様滴状角膜変性症患者より手術時に角膜または結膜組織を採取して、酵素処理にてそれぞれの上皮細胞を得て培養した。

3) SV40 large T 抗原遺伝子と hTERT 遺伝子を発現するレンチウイルスを膠様滴状角膜変性症患者由来の角膜および結膜上皮細胞に感染させた。

4) 上記の不死化操作を施した膠様滴状角膜変性症患者由来の角膜 (GDLD-HCE) および結膜上皮細胞 (GDLD-HCjE) について Population Doubling 解析、免疫染色、ウエスタンブロッティング、コロニーフォーミングアッセイ、SA-beta-gal アッセイ、上皮バリア機能を調べた。

(倫理面への配慮)

本研究では患者への介入は一切行っておらず、研究による危険性は一切ないと言える。また本研究は京都府立医科大学および順天堂大学の倫理委員会の承認のもと行っている。

C. 研究結果

SV40 large T 抗原遺伝子および hTERT 遺伝子は PCR によって cDNA が増幅可能であり、レンチウイルスベクタ

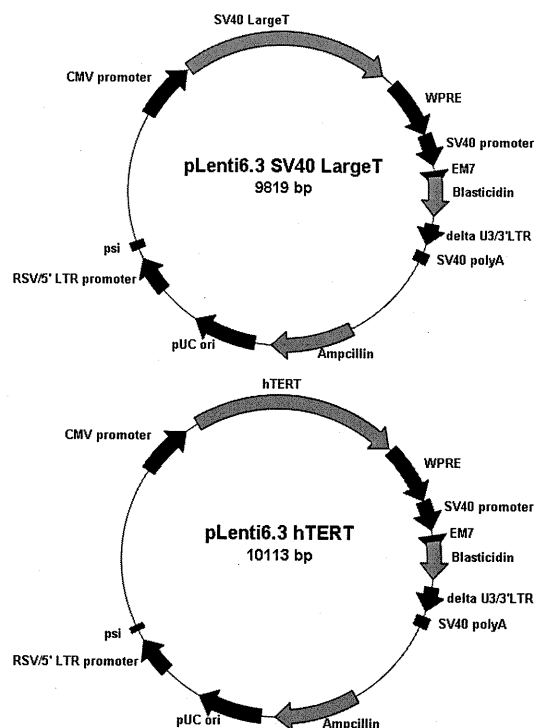


図1 SV40 large T 抗原遺伝子 (上) および hTERT 遺伝子 (下) を発現するレンチウイルスベクター

ーに組み込みレンチウイルスを作製することができた。(図1)

膠様滴状角膜変性症患者の角膜および結膜組織から酵素処理によって上皮細胞を得ることができ、培養することも可能であった。

SV40 large T 抗原遺伝子および hTERT 遺伝子を発現するレンチウイルスを膠様滴状角膜変性症患者の角膜および結膜上皮細胞に感染させた。この不死化操作を行った GDLD-HCE および GDLD-HCjE について免疫染色とウエスタンブロット解析を行い、TACSTD2、SV40 large T antigen、hTERT 遺伝子の発現を調べたところ、TACSTD2 タンパクの発現は認められず (図2)、導入した SV40 large T 抗原および hTERT タンパクの発現は確認された。

不死化操作を行った GDLD-HCE および GDLD-HCjE については細胞増殖能の

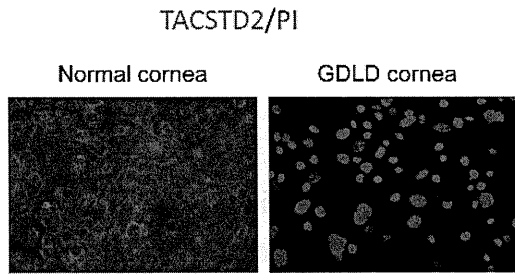


図2
正常者由来の不死化角膜上皮細胞では TACSTD2 タンパクの発現は認められるが、膠様滴状角膜変性症患者由来の不死化角膜上皮細胞では TACSTD2 タンパクの発現は認められない。

著明な亢進が見られた。Population Doubling 解析を行ったところ、コントロールとして用いた、感染させていない細胞では累積 PD が 20PDs 程度で老化状態となり以後は増殖しなかったのに対し、不死化操作を行った細胞では累積 PD が 100PDs を超えても依然として増殖していた。(図 3)

GDLN-HCE および GDLN-HCjE および各々の不死化操作なしの陰性コン

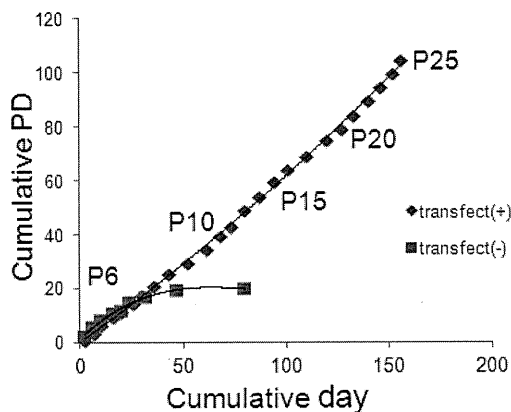


図3
膠様滴状角膜変性症患者由来の角膜上皮細胞に不死化操作を加えたもの (transfect+) と加えていないもの (transfect-) の Population Doubling 解析結果。

トロール細胞について老化状態を調べるために SA-beta-gal アッセイを行った。GDLN-HCE および GDLN-HCjE では SA-beta-gal 活性はわずかの細胞で見

られたのみで、ほとんど老化していないことが分かったが、不死化操作していない細胞ではほとんどの細胞で強い SA-beta-gal 活性が認められ、老化状態になっていることが明らかとなった。またコロニー形成能を調べたところ、GDLN-HCE および GDLN-HCjE では強いコロニー形成活性をもつのに対し、不死化操作していない細胞ではほとんどコロニー形成活性は認められなかった。

前年度の我々の研究結果より膠様滴状角膜変性症患者角膜においてクロロディン1および7のタンパクレベルの発現が著明に低下していることが明らかとなった。そこで GDLN-HCE および GDLN-HCjE においてウェスタンブロットを行ったところ、膠様滴状角膜変性症患者角膜における結果と同様、クロロディン1および7のタンパクレベルの低下が認められた。(図4)

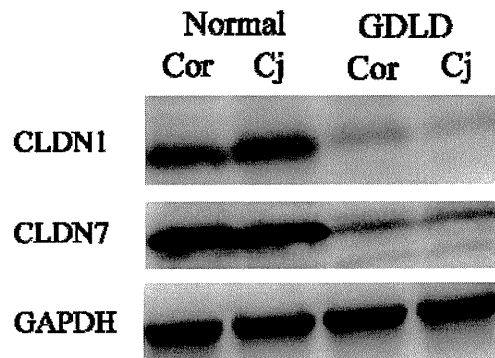


図4
正常者および膠様滴状角膜変性症患者由来の不死化角膜上皮細胞におけるクロロディン1および7タンパクの発現。

また上皮バリア機能を調べたところ、全く同様の不死化操作を行った正常者由来の角膜および結膜上皮細胞においては上皮バリアが培地のカルシウム濃度を高めた後に高まるのに対して、GDLN-HCE および GDLN-HCjE では

若干バリア機能が高まるもののその値は極めて低い値に留まった。(図5)

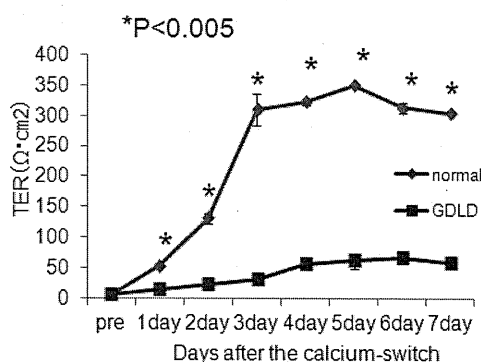


図5 正常者 (normal) および膠様滴状角膜変性症患者 (GDLD) 由来の不死化角膜上皮細胞における上皮バリア機能。

これらのことから我々が不死化した GDLD-HCE および GDLD-HCjE は膠様滴状角膜変性症患者において認められる上皮バリア機能の低下やクロロゲンタンパクの発現低下を忠実に反映していることが明らかとなった。

D. 考案

本研究で我々は膠様滴状角膜変性症患者由来の不死化角膜上皮細胞および結膜上皮細胞を樹立することに成功した。これらの細胞は膠様滴状角膜変性症患者の性質を忠実に反映しており、病態の解明や治療法の開発に有用であると考えられる。

E. 結論

膠様滴状角膜変性症患者由来の不死化角膜上皮細胞および結膜上皮細胞を樹立することに成功した。これらの細胞は病態の解明や治療法の開発に極めて有用と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (平成 23 年度)

1. 論文発表

1. Kawasaki S, Kinoshita S. Clinical and basic aspects of gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Dev Ophthalmol.* 2011;48:97-115.

2. Kawasaki S, Yagi H, Yamasaki K, Matsuda A, Takeda K, Kinoshita S. A novel mutation of the TGFBI gene causing a lattice corneal dystrophy with deep stromal involvement. *Br J Ophthalmol.* 2011;95:150-151.

3. Nakatsukasa M, Kawasaki S, Yamasaki K, et al. Two novel mutations of TACSTD2 found in three Japanese gelatinous drop-like corneal dystrophy families with their aberrant subcellular localization. *Mol Vis.* 2011;17:965-970.

2. 学会発表

1. Kawasaki S, Yamasaki K, Shinomiya K, Kinoshita S. Epigenetic Regulation and Identification of the Cis-Regulatory Region of the Keratin 12 Gene in Rabbit Cornea. ARVO 2011.5.1 Florida USA

2. Kawasaki S. Molecular Pathophysiology of Gelatinous Drop-like Dystrophy. *The Cornea and Tissue Engineering (A*

JSPS-Sponsored Research
Symposium at Cradiff university)
2011.8.19 Cardiff UK

- なし
- 2. 実用新案特許
なし
- 3. その他
なし

H. 知的所有権の取得状況

- 1. 特許取得

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
「膠様滴状角膜変性症の標準治療レジメンの確立と新規療法の創出」

分担研究報告書

「膠様滴状角膜変性新規治療の創出のための基礎的研究」

分担研究者	村上 晶	順天堂大学医学部眼科学教室	教授
研究協力者	海老原伸行	順天堂大学医学部眼科学教室	准教授
	松田 彰	順天堂大学医学部眼科学教室	准教授
	舟木俊成	順天堂大学医学部眼科学教室	准教授

【研究要旨】

膠様滴状角膜ジストロフィ（以下 GDLD）は常染色体劣性遺伝の遺伝形式をもち、重篤な視力障害をきたす遺伝病である。GDLD の原因遺伝子が TACSTD2 であること、また TACSTD2 の変異が角膜上皮細胞のタイトジャンクション形成能に影響することから、TACSTD2 遺伝子を導入した角膜上皮細胞を患者角膜に継続的に移入することが可能であれば、新たな治療法となる可能性が考えられる。本研究では新たに開発したリン酸基を側鎖に有するハイドロゲルからなるコンタクトレンズ（P-CL）をデバイスとした角膜上皮細胞培養及び細胞移入の検討の基礎研究を行った。

A. 研究目的

GDLD 患者に対するソフトコンタクトレンズを用いた遺伝子導入のための基礎研究

角膜上皮移植用デバイスとしては胎盤組織の羊膜が広く用いられているが、その他のデバイスも含めて、その安全性や安定した供給に関して問題もあることから、新たなデバイスの研究が期待されている。そこで我々は、リン酸基を側鎖に有するハイドロゲルからなるコンタクトレンズ（P-CL）をデバイスとした角膜上皮細胞培養及び細胞移入の検討を行った。

B. 研究方法

GDLD 患者に対するソフトコンタクトレンズを用いた遺伝子導入のための基礎研究

SV40 不死化人角膜上皮細胞（HCE-T）を使用し、P-CL 及び各種市販 CL 上における HCE-T の培養を行った。さらに、GFP トランスジェニックラビットの角膜輪部から組織片を採取し、コンタクトレンズ上に幹細胞を単層培養後、コンタクトレンズ上に単層培養した状態で、角膜上皮を剥離した日本白色種家兎眼に装着させ、蛍光顕微鏡による組織学的評価を行った。

（倫理面への配慮）

本研究では患者への介入は一切行っておらず、研究による危険性は一切ないと言える。

C. 研究結果

GDLN 患者に対するソフトコンタクトレンズを用いた遺伝子導入のための基礎研究

in vitro における CL 上に対する HCE-T の培養は材質により異なり、P-CL においては、GFP トランスジェニックラビットの角膜輪部から採取した細胞の増殖も良好であり、免疫染色による未分化細胞マーカー (p63) の発現も認められた。また、CL 上に単層培養した CL を装着させた日本白色家兎眼においても、細胞の移行が認められた。(図 1)

D. 考案

CL をデバイスとした角膜上皮細胞の培養が可能であり、さらに、角膜への細胞移入も可能であることから、角膜移入用デバイスとしての P-CL の使用が有用なデバイスであることが示唆された。

E. 結論

P-CL は細胞移入用のデバイスとして有用であり、今後ウサギ角膜を用いて TACSTD2 遺伝子導入をおこなった角膜上皮細胞の移入実験を予定している

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表

Matsunaga T, Watanabe Y, Sato T et al. Investigation for the Possibility of Using Polymer Hydrogels as a Device for Cultivation and Transplantation of Corneal Epithelial Cells. The annual meeting for the Association for Research in Vision and Ophthalmology. 10, May 2012. Ft. Lauderdale. FL.

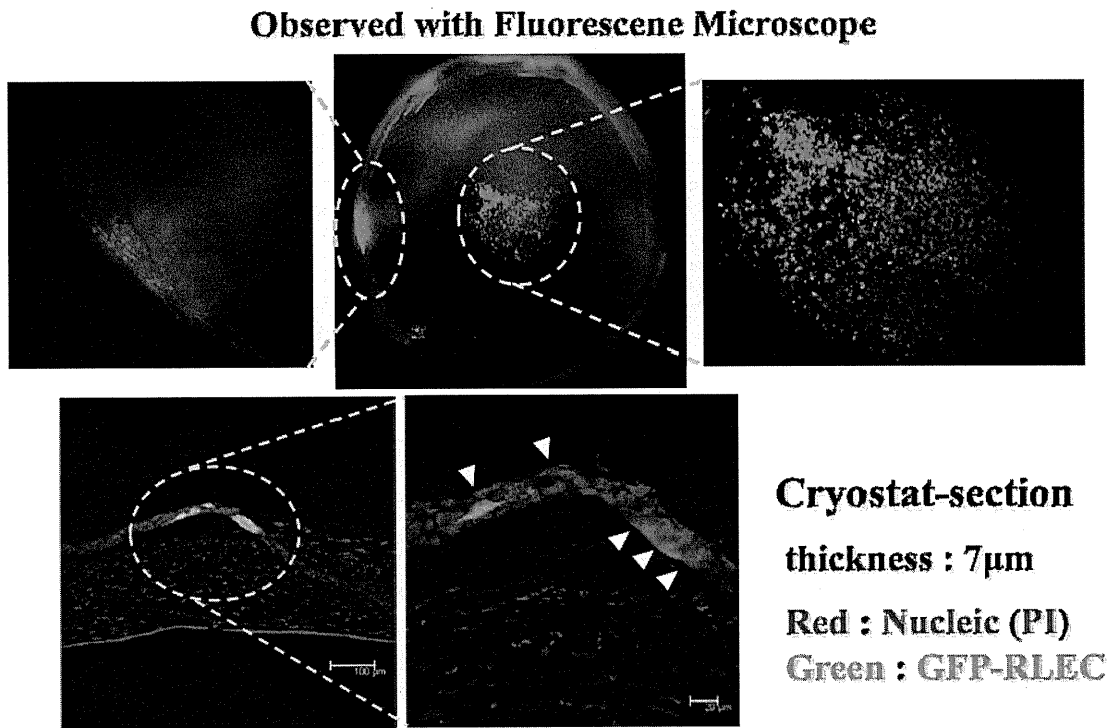
2. 論文発表

1. Iwamoto S, Ebihara N, Hori K, et al. Filaggrin mutations are not associated with chronic allergic keratoconjunctivitis. *Br J Ophthalmol* in Press.
2. Hori K, Matsuda A, Ebihara N, et al. Involvement of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in the Pathogenesis of Atopic Cataracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* in Press
3. Inomata T, Ebihara N, Funaki T, et al. Perlecan-Deficient Mutation Impairs Corneal Epithelial Structure. *Invset Ophthalmol Vis Sci.* in Press
4. Ebihara N, Matsuda A, Nakamura S, et al. Role of the IL-6 classic and trans-signaling pathways in corneal sterile inflammation and wound healing. *Invset Ophthalmol Vis Sci.* in Press

H. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|--------|
| 1. 特許取得 | なし |
| なし | 3. その他 |
| 2. 実用新案特許 | なし |

図 1



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
「膠様滴状角膜変性症の標準治療レジメンの確立と新規療法の創出」

分担研究報告書

「膠様滴状角膜ジストロフィの遺伝的背景」

分担研究者 辻川元一 大阪大学医学部眼科学教室 助教
研究協力者 西田幸二 大阪大学医学部眼科学教室 教授
相馬剛至 大阪大学医学部眼科学教室 医員

【研究要旨】

膠様滴状角膜ジストロフィ（以下 GDL D）は常染色体劣性遺伝の遺伝形式をもつ失明にいたる重篤な遺伝病である。頻度は 30 万人に 1 人とされ比較的まれな疾患ではあるが、患者のほとんどが日本人であることが特徴的である。したがって、本邦以外での疫学的研究や病因論解明は難しく、治療法確立のためには本邦の研究機関が共同して研究していく必要がある疾患であると認識されている。我々は、この疾患の原因遺伝子を Positional Cloning 法で単離し、第 1 番染色体上にあり、1 回膜貫通型の蛋白である TACSTD2 であることを示した（Nature Genet. 1999）。これにより、GDL D の分子生物学的解析に道が開かれた。さらに、当研究班ではこの TACSTD2 がクローデインの安定化を通して角膜のバリア機能の維持に重要であることを明らかにしてきた。今回我々は正常角膜だけでなく、角膜治療に使用している各種細胞上皮シートや、基礎的研究やモデルとして重要な動物種角膜において TACSTD2 の発現解析を行った。これにより、病因の解析と標準的治療レジメンの確立に貢献した。

A. 研究目的

膠様滴状ジストロフィ原因遺伝子
TACSTD2 の発現解析

膠様滴状角膜ジストロフィの原因遺伝子として我々は Positional Cloning を用いて TACSTD2 を単離した。さらにこの翻訳産物 TACSTD2 は角膜上皮層のバリア機能に重要な役割を果たしていることを我々の研究班が既に報告している。しかしながら、実際

の臨床において使用されるような角膜上皮再生治療に使われる細胞シートにおける発現や今後の研究に必要な種差について詳細は不明である。今回、各種細胞シート、マウス角膜における TACSTD2 の発現を解析した。

B. 研究方法

1) ヒト角膜、マウス角膜、ヒト角膜上皮細胞シート、ヒト口腔粘膜上